

Rec'd PCT/PTO 25 APR 2005

PCT/NL 03 / 007 28

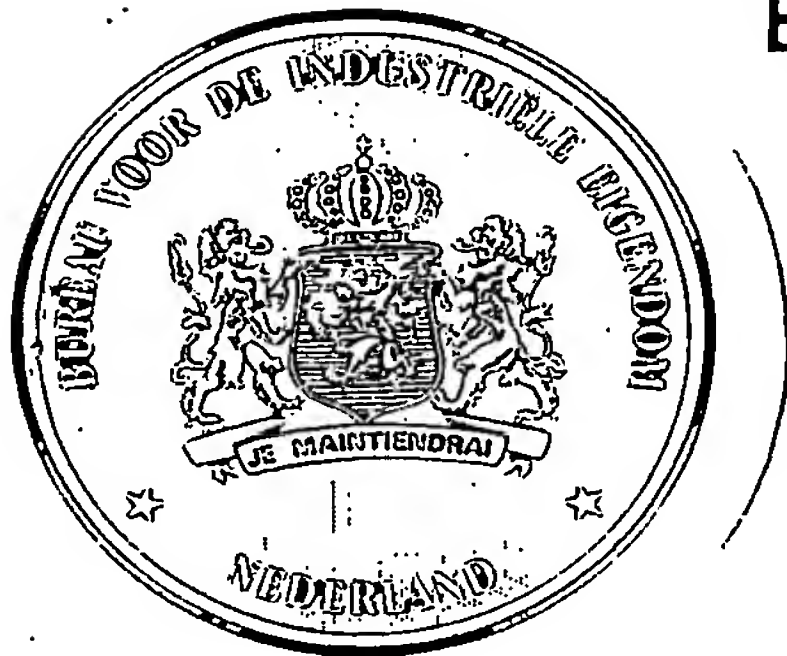
10/532512

KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



REC'D 12 NOV 2003

WIPO

PCT

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 25 oktober 2002 onder nummer 1021753,  
ten name van:

**NEDERLANDSE ORGANISATIE VOOR TOEGEPAST-  
NATUURWETENSCHAPPELIJK ONDERZOEK TNO**

te Delft

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Detectie van osteoarthritis",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 6 november 2003

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,  
voor deze,

Mw. I.W. Scheevelenbos-de Reus

1021753

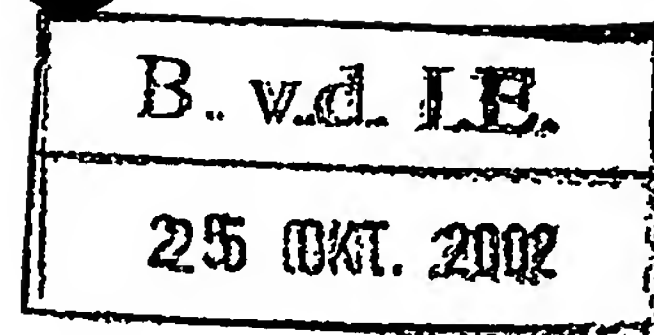
B. v.d. I.E.

25 OKT. 2002

# UITTREKSEL

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor de detectie van osteoarthritis in een zoogdier, omvattende de stappen van het verschaffen van een NMR spectrum van metabolieten in een lichaamsvloeistof van een individu van genoemd zoogdier waarin osteoarthritis wordt vermoed en het vergelijken van genoemd NMR spectrum met een verschilprofiel omvattende een meervoudigheid van waarden van NMR spectraallijnen, dat het genormaliseerd verschil uitdrukken tussen één of meer NMR spectra van metabolieten in een lichaamsvloeistof van één of meer gezonde individuen van genoemd zoogdier, en één of meer overeenkomstige NMR spectra van metabolieten in een overeenkomstige lichaamsvloeistof van één of meer individuen van genoemd zoogdier waarin osteoarthritis is vastgesteld. De uitvinding heeft tevens betrekking op het genoemde verschilprofiel voor de detectie van osteoarthritis in een zoogdier en op werkwijzen voor de vervaardiging daarvan.

102175



P60474NL00

Titel: Detectie van osteoarthritis.

De uitvinding heeft betrekking op een verschilprofiel tussen NMR spectra als metabolietpatronen voor osteoarthritis, op een werkwijze voor het vervaardigen van een dergelijk verschilprofiel en op een werkwijze voor detectie van osteoarthritis in een zoogdier met behulp van een  
5 verschilprofiel volgens de uitvinding. De uitvinding heeft tevens betrekking op biomarkers voor detectie van osteoarthritis in een zoogdier en op werkwijzen voor detectie van osteoarthritis in een zoogdier met behulp van dergelijke biomarkers. Ten slotte heeft de onderhavige uitvinding betrekking op een werkwijze voor de identificatie van biomarkers met  
10 behulp van een verschilprofiel.

Osteoarthritis (kraakbeen degeneratie) is een van de meest voorkomende ziekten bij ouderen en komt voor bij meer dan 50% van de personen in de leeftijd boven 65 jaar. Osteoarthritis wordt gekenmerkt door voortschrijdende afbraak van articulaire kraakbeen en resulteert in  
15 verslechterde beweging, pijn en uiteindelijk invaliditeit. Naast kraakbeen afbraak wordt osteoarthritis pathologisch gekenmerkt door veranderingen in subchondraal bot (sclerose, cysten), osteofyt vorming en milde synoviale ontsteking. De etiologie en pathogenese van osteoarthritis is echter grotendeels onduidelijk.

20 De klinische diagnose van osteoarthritis is gebaseerd op het waarnemen van klinische verschijnselen in combinatie met radiologisch onderzoek naar veranderingen in het gewricht, met name gerelateerd aan de breedte van de gewrichtsruimte. Deze veranderingen kunnen echter alleen worden waargenomen in een vergevorderd stadium van de ziekte. Veelal is  
25 de schade aan de gewrichten dan al onomkeerbaar. Omdat radiologische bepaling van de breedte van de gewrichtsruimte relatief ongevoelig is, is bovendien na ten minste 1 en bij voorkeur 2 jaar een vervolgonderzoek nodig om de voortschrijding van de ziekte en het eventuele effect van een

therapie te kunnen bepalen. De behandeling van osteoarthritits wordt daardoor sterk bemoeilijkt.

Er bestaat een grote behoefte aan alternatieve werkwijzen die kwantitatief, betrouwbaar, gevoelig en specifiek osteoarthritits gerelateerde veranderingen in de gewrichten kunnen aantonen. Voorts is er behoefte aan een werkwijze waarmee in een vroeg stadium osteoarthritits kan worden gediagnosticeerd, bij voorkeur voordat onomkeerbare veranderingen hebben plaatsgevonden.

De toepassing van moleculaire merkers (of biomarkers) die specifiek zijn voor osteoarthritits zou in deze behoeften kunnen voorzien en kan een belangrijke bijdrage leveren aan diagnose, prognose, en monitoring van de voortgang van de ziekte. Voorts zou met dergelijke moleculaire merkers het onderzoek naar het effect van klinische behandelingstherapieën en de ontwikkeling van nieuwe medicijnen kunnen worden vergemakkelijkt. Moleculaire merkers worden dan ook cruciaal geacht voor het effectief uitvoeren van preklinische studies (zowel *in vitro* als *in vivo* in proefdieren) en studies gericht op de pathofysiologie van osteoarthritits.

Een ideale moleculaire merker is ziekte-specifiek, weerspiegelt de werkelijke ziekte activiteit, kan gebruikt worden voor de bepaling van effectiviteit van therapie en draagt bij aan de betrouwbare prognose van de ziekte. Al deze vereisten behoeven echter niet in één enkele merker geïntegreerd te zijn, een combinatie van complementaire merkers is mogelijk en zou in bepaalde gevallen zelfs beter kunnen werken.

Merkers die op dit moment worden toegepast in osteoarthritits-gerelateerd onderzoek omvatten moleculen als COMP (cartilage oligomeric matrix protein), dat echter niet specifiek is voor kraakbeen en Glc-Gal-PYD (glucosyl-galactosyl pyridinoline) dat een merker voor de afbraak van synoviaal weefsel (slijmvlies bekleding) is en daarom niet als een diagnostisch merker van kraakbeenafbraak kan dienen. Een andere

toegepaste merker is CTX-II, het C-terminale gecrosslinkte telopeptide van type II collageen. Deze merker is collageen-specifiek. Maar aangezien osteoarthritis meerder dan alleen collageen-gerelateerde componenten omvat kan toepassing van deze merker resulteren in vals negatieve  
5 uitslagen.

De onderhavige uitvinding heeft ten doel om nieuwe systemen en werkwijzen te verschaffen voor de detectie van osteoarthritis.

Een ander doel van de onderhavige uitvinding is het verschaffen van systemen en werkwijzen zoals bovenomschreven die ten minste enkele  
10 van de problemen geassocieerd met bestaande systemen en werkwijzen voor de detectie van osteoarthritis oplossen.

Nog een doel van de onderhavige uitvinding is gelegen in het verschaffen van systemen en werkwijzen zoals bovenomschreven die toegepast kunnen worden in *in vivo* en/of *in vitro* medische diagnostiek.

15 Er is nu gevonden dat in de urine van een individu met osteoarthritis metabolieten voorkomen die niet, of in grotere of kleinere hoeveelheid, voorkomen in gezonde individuen. De aanwezigheid van deze osteoarthritis-specifieke metabolietconcentraties kon worden aangetoond met behulp van proton kernspinresonantie ( $^1\text{H}$  NMR) spectroscopische  
20 analyse van de metabolieten in de urine van zoogdieren. Deze metabolieten kunnen individueel of in combinatie als biomarkers worden toegepast in de diagnostiek en prognostiek van osteoarthritis.

Er is verder gevonden dat een verzameling van statistisch significante verschillen tussen de signaalintensiteit van een groot aantal  
25 spectraallijnen met gedefinieerde posities in het NMR spectrum, opgenomen van metabolieten in de urine van een gezond individu, en de signaalintensiteit van overeenkomstige spectraallijnen in het NMR spectrum opgenomen van metabolieten in de urine van een individu met osteoarthritis, een metabolietpatroon kan verschaffen dat de detectie van  
30 osteoarthritis vergemakkelijkt. Dit metabolietpatroon wordt in de



onderhavige uitvinding aangeduid als een verschilprofiel of metabole fingerprint. Een dergelijk verschilprofiel kan grafisch worden weergegeven als een factor spectrum (zie Figuur 2).

De onderhavige uitvinding heeft daarom betrekking op een  
 5 verschilprofiel voor de detectie van osteoarthritis in een zoogdier,  
 omvattende een meervoudigheid van spectraallijnposities en optioneel  
 bijbehorende signaalintensiteiten van NMR spectraallijnen, die het  
 genormaliseerd verschil uitdrukken tussen één of meer NMR spectra van  
 10 metabolieten in een lichaamsvloeistof van één of meer gezonde individuen  
 van genoemd zoogdier, en één of meer overeenkomstige NMR spectra van  
 metabolieten in een overeenkomstige lichaamsvloeistof van één of meer  
 individuen van genoemd zoogdier waarin osteoarthritis is vastgesteld.

Figuur 1 is een weergave van een score plot van NMR spectra  
 verkregen op de wijze zoals beschreven in de onderstaande beschrijving en  
 15 Voorbeeld 1. Op de horizontale as staat component D1 (100.00 %) uitgezet.  
 Op de verticale as staat component D2 (0.00 %) uitgezet. Het linker  
 ononderbroken omliggende cluster (A) is een cluster van NMR spectra van  
 gezonde, controle individuen, terwijl het rechter onderbroken omliggende  
 cluster (B) een cluster van NMR spectra van osteoarthritis patiënten  
 20 weergeeft.

Figuur 2 is een weergave van een factor spectrum (ook  
 verschilprofiel of metabole fingerprint) van osteoarthritis verkregen op de  
 wijze zoals beschreven in de onderstaande beschrijving en Voorbeeld 1. Op  
 de horizontale as staat de spectraallijnpositie in "ppm" uitgezet. Op de  
 25 verticale as staat de signaalintensiteit in "Regression".

Een verschilprofiel is in de onderhavige uitvinding gedefinieerd als  
 een kenmerkende selectie van NMR spectraallijnen met gedefinieerde  
 posities waarvan de signaalintensiteit significant verschilt in  
 genormaliseerde NMR spectra van metabolieten in een lichaamsvloeistof  
 30 van osteoarthritis patiënten ten opzichte van genormaliseerde NMR spectra

van metabolieten in een lichaamsvloeistof van gezonde individuen. Een dergelijk verschilprofiel omvat de spectraallijnposities en eventueel de daarbij behorende signaalintensiteiten.

5 Een genormaliseerd NMR spectrum is in de onderhavige uitvinding gedefinieerd als een NMR spectrum waarin de verscheidenheid of variatie in de signaalintensiteiten van de spectraallijnen tussen monsters is beperkt door rekenkundige verdiscontering van uitschieters. Voor normalisatie wordt de som van kwadraten van alle intensiteiten gelijk gesteld aan 1. De reden hiervoor is dat verondersteld wordt dat ieder monster een gelijke  
10 hoeveelheid informatie omvat. Door het uitvoeren van normalisering wordt de absolute hoeveelheid informatie in ieder NMR spectrum gelijk gesteld (gelijke oppervlakten onder de NMR spectra) waardoor zij onderling vergelijkbaar worden.

Een veranderde signaalintensiteit van een bepaalde spectraallijn  
15 in twee vergelijkbare NMR spectra geeft aan dat de concentratie van waterstofatomen in één van die monsters is veranderd en dat daarmee de hoeveelheid van een of meer chemische bestanddelen die deze atomen bevatten, in dit geval metabolieten, in één van die monsters is veranderd.

Een verschilprofiel volgens de uitvinding omvat dus een  
20 verzameling van spectraallijnposities in een genormaliseerd NMR spectrum waarvan de bijbehorende signaalintensiteit vanwege osteoarthritis significant verhoogd of verlaagd is ten opzichte van de signaalintensiteit van overeenkomstige spectraallijnposities in een genormaliseerd NMR spectrum van gezonde individuen.

25 Bij voorkeur omvat een verschilprofiel volgens de uitvinding spectraallijnposities waarvan de bijbehorende spectraallijnsignaalintensiteiten in het spectrum van een osteoarthritis patiënt met een bepaalde factor verhoogd en/of verlaagd zijn ten opzichte van een corresponderende spectrum van een gezond individu. Deze factor  
30 kan worden gehanteerd door het aanleggen van een grenswaarde (threshold

of referentiewaarde). Spectraallijnposities waarvan de bijbehorende spectraallijnsignaalintensiteiten boven of onder de grenswaarde uitkomen worden in het verschilprofiel opgenomen. De endogene en exogene metabolieten zijn uit een dergelijk verschilprofiel geëlimineerd waardoor de data tot specifieke en "significante" osteoarthritis-gerelateerde veranderingen wordt teruggebracht.

Voor het elimineren van endogene en exogene metabolieten uit een verschilprofiel volgens de uitvinding kan zeer geschikt een grenswaarde die correspondeert met ongeveer anderhalf maal, bij voorkeur ongeveer twee maal, bij grotere voorkeur ongeveer drie maal de signaal/ruis verhouding in het genormaliseerde spectrum worden toegepast. Hierin wordt met ruis in het NMR spectrum de signalen afkomstig van a-specifieke meetgebeurtenissen bedoeld, zoals bijvoorbeeld machineruis, omgevingsfluctuaties, en/of vervuilingen in de chemicaliën.

Tevens is het mogelijk om de als grenswaarde bijvoorbeeld de waarde van de gemiddelde signaalintensiteit van 60-99%, bij voorkeur van 70-95%, bij groter voorkeur van 80-90% van alle spectraallijnposities die een verandering in intensiteit vertonen tussen gezonde individuen en osteoarthritis patienten toe te passen ter verkrijging van een verschilprofiel volgens de uitvinding.

De keuze voor de hoogte van een grenswaarde zal tevens onder andere afhangen van de individuele eigenschappen van het zoogdier waarvoor het verschilprofiel wordt vastgesteld. Dergelijke eigenschappen omvatten geslacht, leeftijd, levensfase (fertil/infertil), dieet, eventueel medicijngebruik, genetische achtergrond, en bij mensen tabak en/of alcoholgebruik. De toepassing van homogene groepen van individuen heeft in hieronder beschreven werkwijzen volgens de uitvinding de voorkeur, waarbij een homogene groep is gedefinieerd als een groep van individuen met zo veel als mogelijk vergelijkbare eigenschappen en met als enkel verschil de aan- of afwezigheid van de ziekte.



Bij voorkeur omvat een genormaliseerd spectrum van metaboliëten in een lichaamsvloëistof van een zoogdier een set aan gegevens die afkomstig zijn van een homogene groep individuen. Dat wil zeggen dat een verschilprofiel volgens de uitvinding voor detectie van osteoarthritis in een mannelijk individu, NMR spectraallijnposities met bijbehorende spectraallijnsignaalintensiteiten van bij voorkeur uitsluitend mannelijke individuen omvat. Een verschilprofiel voor osteoarthritis kan daarom verschillend zijn afhankelijk van de eigenschappen van de individuen waaruit zij is verkregen.

Bij voorkeur vertegenwoordigt een genormaliseerd spectrum van metaboliëten in een lichaamsvloëistof van een zoogdier een set aan gegevens die afkomstig is van ten minste twee, bij grotere voorkeur ten minste drie, bij nog grotere voorkeur ten minste vier en bij zelfs nog grotere voorkeur ten minste vijf individuen.

Een verschilprofiel kan zeer geschikt 3 tot 1000 spectraallijnposities die behoren bij eventueel originele spectraallijnen omvatten. Bij voorkeur omvat een verschilprofiel volgens de uitvinding 10 tot 500, bij grotere voorkeur 15 tot 100, en bij nog grotere voorkeur 20 tot 70 spectraallijnposities. Zeer goede resultaten zijn verkregen met een verschilprofiel omvattende 30 tot 50 spectraallijnposities.

Het aantal spectraallijnposities waaruit het verschilprofiel is opgebouwd wordt voornamelijk bepaald door definiëring van genoemde grenswaarde. Deze grenswaarde, waarin de waarde voor de hoogte van de ruis in de genormaliseerde spectra kan zijn verdisconteerd, geeft aan vanaf welke waarde verschillen in de hoogte van een spectraallijn tussen individuen waarin osteoarthritis is vastgesteld en gezonde individuen "significant" zijn. Een verschil in hoogte kan zowel positief (verhoging van intensiteit) als negatief (verlaging van intensiteit) zijn.

Er dient te worden vermeld dat detectie van osteoarthritis door middel van een verschilprofiel volgens de uitvinding bij voorkeur wordt

toegepast op individuen met eigenschappen die overeenkomstig of gelijksoortig zijn aan die van individuen waaruit het verschilprofiel is verkregen, maar noodzakelijk is dit zeker niet.

De onderhavige uitvinding heeft tevens betrekking op een werkwijze voor het vervaardigen van een verschilprofiel voor de detectie van osteoarthritis in een zoogdier.

Een verschilprofiel volgens de uitvinding kan zeer geschikt worden vervaardigd middels een werkwijze omvattende de stap van het verschaffen van een set van posities en corresponderende intensiteiten van spectraallijnen in een NMR spectrum dat is opgenomen van metaboliëten in een lichaamsvloeistof van gezonde individuen van een zoogdier.

Als lichaamsvloeistof die kan worden toegepast in een werkwijze volgens de uitvinding kan in beginsel iedere lichaamsvloeistof worden genomen. Bij voorkeur wordt een lichaamsvloeistof toegepast die op niet-invasieve wijze kan worden verkregen. De lichaamsvloeistof is bij grote voorkeur urine.

Hoewel in uitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding in beginsel verschillende meetmethoden voor het meten van metaboliëten in een lichaamsvloeistof toegepast kunnen worden, wordt bij voorkeur proton kernspinresonantie spectroscopie toegepast. Een NMR instrument met een frequentie van ten minste ongeveer 200 MHz is in principe geschikt, maar de voorkeur gaat uit naar toepassing van instrumenten met een hogere frequentie, zoals ten minste ongeveer 300 MHz, bij grotere voorkeur ten minste ongeveer 400-600 MHz.

Voor het uitvoeren van NMR spectroscopische analyse kunnen monsters van een lichaamsvloeistof zeer geschikt worden gevriesdroogd en het lyofilisaat kan vervolgens worden gereconstitueerd in een geschikte buffer, bijvoorbeeld een natriumfosfaat buffer, welke is bereid op basis van  $D_2O$ . Een geschikte zuurgraad voor een dergelijke buffer ligt in het bereik van pH 4-10, bij voorkeur van pH 4-8 en bij grote voorkeur ongeveer pH 6.

Bij voorkeur worden verschillende monsters die onderling vergeleken gaan worden gereconstitueerd in buffers van gelijke pH. Het reconstitueren van de gevriesdroogde bestanddelen van een monster van een lichaamsvloeistof in een buffer van gelijke pH dient ertoe om spectrale verschillen veroorzaakt door verschillen in pH tussen verschillende monsters te minimaliseren. Aan het gereconstitueerde monster kan voorts een interne standaard, zoals bijvoorbeeld TMSP (natrium trimethylsilyl-[2,2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-1-propionate) of tetramethylsilane worden toegevoegd. Vervolgens kan van deze monsters een NMR spectrum worden opgenomen waarbij het NMR instrument voor <sup>1</sup>H NMR analyse wordt ingesteld. Bij voorkeur wordt een NMR spectrum van een monster in triplo opgenomen. Over het algemeen kunnen hiertoe standaard instellingen zoals aanbevolen door de fabrikant worden toegepast. De meetresultaten worden weergegeven in chemische verschuiving ("chemical shift") ten opzicht van de interne standaard en uitgedrukt in "ppm" (parts per million). In de onderhavige uitvinding wordt, zoals gebruikelijk in het vakgebied, een spectraallijnpositie uitgedrukt in "ppm", terwijl de signaalintensiteit wordt uitgedrukt in "regression" (zie ook Figuur 2)

Op de opgenomen spectra wordt eventueel een manuele basislijncorrectie toegepast en de spectra worden vervolgens middels standaard NMR procedures verwerkt tot zgn. "line listings". Hiertoe worden alle lijnen in de spectra boven de ruis verzameld en omgezet in een gegevensbestand dat geschikt is voor multivariate data analyse.

Bij voorkeur worden meerdere gezonde individuen van betreffend zoogdier gemeten zodat uitschieters rekenkundig kunnen worden verdisconteerd. Dergelijke rekenkundige verdiscontering kan zeer geschikt plaatsvinden middels het proces van normalisatie van de meetgegevens. Tevens worden voor het bepalen van een genormaliseerd spectrum van

metabolieten in een lichaamsvloeistof van een zoogdier bij voorkeur spectra afkomstig van een homogene groep van individuen gebruikt.

Normalisatie van meerdere opgenomen NMR spectra draagt bij aan de betrouwbaarheid van een set aan waarden verkregen uit een meervoudigheid van individuen. Voorts maakt normalisatie de vergelijking van een afzonderlijk opgenomen spectrum met een set reeds eerder opgenomen spectra mogelijk.

Een werkwijze voor het vervaardigen van een verschilprofiel omvat tevens de stap van het verschaffen van een set van posities en corresponderende signaalintensiteiten voor spectraallijnen in een NMR spectrum dat op overeenkomstige wijze is opgenomen van metabolieten in een overeenkomstige lichaamsvloeistof van individuen van datzelfde zoogdier waarin osteoarthritis is vastgesteld.

Bij voorkeur worden hier eveneens meerdere individuen van een homogene groep van betreffend zoogdier waarin osteoarthritis is vastgesteld gemeten zodat uitschieters rekenkundig kunnen worden verdisconteerd. Bij voorkeur geschiedt normalisatie van meerdere opgenomen NMR spectra op bovenomschreven wijze. Op de opgenomen spectra wordt eventueel een manuele basislijncorrectie toegepast en de spectra worden vervolgens middels standaard NMR procedures verwerkt tot zgn. "line listings". Hiertoe worden alle lijnen in de spectra boven de ruis verzameld en omgezet in een gegevensbestand dat geschikt is voor multivariate data analyse.

Tenslotte omvat een werkwijze voor het vervaardigen van een verschilprofiel de stap van het vergelijken van de genormaliseerde waarden van genoemde eerste en tweede set, en het detecteren van de verschillen daartussen ter verkrijging van een verschilprofiel volgens de uitvinding.

Multivariate data analyse of patroonherkenning kan zeer geschikt worden toegepast om verschillen gerelateerd aan ziekte en behandeling te visualiseren in deze spectra. Bijzondere voorkeur gaat uit naar de rekenkundige methode gebaseerd op het Partial-Linear-Fit algoritme zoals



beschreven in WO 02/13228. Dit algoritme maakt aanpassing van kleine variaties in de positie van de spectraallijn in NMR spectra mogelijk zonder verlies aan resolutie.

Het bovenbeschreven Partial-Linear-Fit algoritme omvat een onderdeel principale componenten discriminant analyse (PCDA). Hierbij wordt het aantal variabelen eerst gereduceerd middels principale componenten analyse (PCA). De projecties, zogenaamde scores, van monsters op de eerste principale componenten (PCs) worden als beginpunt gebruikt voor lineaire discriminant analyse. De scores van de monsters worden geplot in een score plot, waar op elkaar lijkende monster de neiging hebben om een cluster te vormen en niet op elkaar lijkende monsters op een grotere afstand zullen liggen (zie Figuur 1). De relatie van discriminant assen met de originele variabelen (NMR signalen) wordt visueel gemaakt in een "loading" plot. Hierin wordt de positie van de originele variabelen weergegeven zodat de lengte van de variabele vector parallel aan een discriminant as proportioneel is aan de importantie ("loading") van die variabele tot die as.

Een andere mogelijkheid om de gegevens te visualiseren is door middel van factor spectra (zie o.a. Figuur 2), die correleren met de positie van clusters in score plots (bijv. het cluster osteoarthritis in Fig 1) door grafische rotatie van "loading" vectoren. Deze factor spectra, of metabolic fingerprints, gemaakt in de richting van maximale scheiding van de ene categorie ten opzichte van een andere categorie, geven inzicht in de typen metaboliëten die verantwoordelijk zijn voor scheiding tussen de categorieën.

Een verschilprofiel volgens de onderhavige uitvinding kan daarom zeer geschikt worden weergegeven als een factor spectrum, waarvan een voorbeeld is weergegeven in Figuur 2, of als een tabel met spectraallijnposities, waarvan een voorbeeld is weergegeven in Tabel 1.

Aangezien in de onderhavige uitvinding voor het verkrijgen van numerieke gegevens omtrent metaboliëten de analytische methodiek van



proton kernspinresonantie spectroscopie wordt toegepast zijn de verkregen waarden afhankelijk van de instellingen van het instrument en de condities waaronder de meting wordt uitgevoerd. Tevens zijn de absolute waarden afhankelijk van de referentie (bijv. de interne standaard) die bij de meting  
5 wordt toegepast. Een verschilprofiel, zoals dat is weergegeven in Tabel 1, omvat daarmee waarden die tussen verschillende meetmomenten en tussen verschillende meetcondities kunnen verschillen. Om die reden zijn de waarden zoals weergegeven in Tabel 1 geen absolute waarden. De betekenis van de individuele waarden van zowel de spectraallijnposities als van de  
10 eventuele spectraallijnintensiteiten in het verschilprofiel voor osteoarthritis is daarmee hoofdzakelijk gelegen in hun verhouding en positie ten opzichte van elkaar en dus in het patroon van deze waarden.

De onderhavige uitvinding heeft voorts betrekking op een werkwijze voor de detectie van osteoarthritis in een zoogdier, omvattende de  
15 stappen van het verschaffen van een NMR spectrum van metabolieten in een lichaamsvloeistof van een individu van genoemd zoogdier waarin osteoarthritis wordt vermoed en het vergelijken van genoemd NMR spectrum met een verschilprofiel volgens de uitvinding bepaald voor een overeenkomstige lichaamsvloeistof in een overeenkomstig zoogdier. Een  
20 dergelijke vergelijkingsstap kan visueel, maar ook rekenkundig worden uitgevoerd.

Het is mogelijk, maar niet noodzakelijk, om het NMR spectrum van metabolieten in een lichaamsvloeistof van een individu van genoemd zoogdier waarin osteoarthritis wordt vermoed voorafgaand aan het  
25 vergelijken daarvan met een verschilprofiel volgens de uitvinding te normaliseren en te vergelijken met spectra van metabolieten in een lichaamsvloeistof van gezonde individuen van betreffend zoogdier. Indien uit de vergelijkingsstap blijkt dat het kenmerkende verschilprofiel inderdaad omvat is in het spectrum dat is opgenomen van een individu

waarin osteoarthritis wordt vermoed wordt daarmee de aanwezigheid van osteoarthritis vastgesteld.

Het is eveneens mogelijk om de gegevens van het spectrum dat is opgenomen van een individu waarin osteoarthritis wordt vermoed uit te  
 5 zetten in een score-plot, zoals bijvoorbeeld het score plot van Figuur 1, en te bepalen of de gegevens vallen binnen het cluster van "osteoarthritis" spectra. Indien de bedoelde gegevens van een individu waarin osteoarthritis wordt vermoed niet binnen het cluster aangeduid met "osteoarthritis" vallen is geen sprake van de ziekte in het betreffende individu. Een dergelijke  
 10 diagnostische werkwijzestap wordt in de onderhavige uitvinding geacht omvat te zijn in de stap voor het vergelijken van een NMR spectrum met een verschilprofiel.

Metabolieten zijn afval producten die in verschillende vormen en aantallen voorkomen in het lichaam. Zo is in een gezond lichaam de  
 15 verhouding en het voorkomen van metabolieten in een lichaamsvloeistof, zoals urine of bloed, totaal anders dan in een ongezond lichaam.

Met behulp van biomarkers is het in principe mogelijk om de ongezonde toestand snel te onderscheiden van een gezonde toestand. Met een biomarker wordt in het onderhavige verband een organische verbinding  
 20 of het metaboliet daarvan of specifieke patronen of specifieke hoeveelheden van meerdere organische verbindingen of hun metabolieten bedoeld die in het lichaam van een zoogdier kan/kunnen worden aangetroffen en die het gevolg is/zijn van een sub-klinische of klinische gebeurtenis in dat lichaam.

De onderhavige uitvinding verschaft een werkwijze voor de  
 25 identificatie van een biomarker voor osteoarthritis, omvattende het vervaardigen van een verschilprofiel volgens de uitvinding en het identificeren van een metaboliet gekenmerkt door één of meer gedefinieerde spectraallijnen in genoemd verschilprofiel.

Het bepalen van de identiteit van een metaboliet gekenmerkt door  
 30 één of meer gedefinieerde spectraallijnen in een verschilprofiel kan

bijvoorbeeld geschieden door koppeling van een massaspectrometer aan het NMR instrument en het analyseren van het metaboliet corresponderend met één of meer gedefinieerde spectraallijnen middels massa spectrometrie (MS). De vakman is bekend met massa spectrometrie ter identificatie van stoffen en metabolieten. Het bepalen van de identiteit van een metaboliet behorende bij één of meer gedefinieerde spectraallijnen kan evenwel ook geschieden door van bekende metabolieten het NMR spectrum op te nemen en deze te vergelijken met de NMR spectraallijnen in een verschilprofiel volgens de uitvinding.

Er kon worden vastgesteld dat een verschilprofiel voor osteoarthritis volgens de uitvinding, zoals weergegeven in Figuur 2 en Tabel 1, spectraallijnen met een positieve regressie bevat die kenmerkend zijn voor o.a. melkzuur, appelzuur, mercaptuurzuur en/of acetyl cysteine en monofosfaten. Er wordt verondersteld dat deze metabolieten als gevolg van de manifestatie van osteoarthritis en de complexe afbraak en ontstekingsverschijnselen die daarmee gepaard gaan in de urine worden uitgescheiden en dat daarmee de uitscheiding van deze metabolieten in de urine specifiek is voor de aanwezigheid van osteoarthritis.

De hierboven vermelde metabolieten komen in verhoogde hoeveelheid voor in de urine van osteoarthritis patiënten, en zijn daarom uitermate geschikt om te worden toegepast als biomarker. Metaboloeten die in hoeveelheid afnemen laten zich minder goed toepassen als biomarker vanwege het gevaar van vals negatieve uitslagen bij bepaalde detectie-methoden.

De bovenvermelde metabolieten kunnen daarom zeer geschikt worden toegepast als biomarkers in een systeem voor de snelle detectie van osteoarthritis. Het is niet bekend of de bedoelde metabolieten in vrije toestand of in een gederivatiseerd vorm, bijvoorbeeld geconjugeerd of op andere wijze gebonden, in de urine worden uitgescheiden. Indien dat het geval is dan dienen de gevonden waarden verdisconteerd te worden met de

gemiddelde concentratie van deze stoffen in de lichaamsvloeistof van niet-zieken. De vakman zal evenwel begrijpen dat de beschreven metabolieten in welke toestand dan ook in de lichaamsvloeistof voorkomend als biomarker kunnen worden toegepast.

5 De uitvinding heeft dan ook tevens betrekking op een biomarker voor diagnose en prognose van osteoarthritis, met het kenmerk dat de biomarker wordt gevormd door ten minste één verbinding omvattende een metaboliet gekozen uit de groep bestaande uit melkzuur, appelzuur, mercaptuurzuur, acetyl cysteine, monofosfaat verbindingen en functionele  
10 analogen daarvan.

De onderhavige uitvinding heeft voorts betrekking op een werkwijze voor de detectie van osteoarthritis in een zoogdier, omvattende de detectie van veranderingen in het voorkomen van een biomarker volgens de uitvinding in een lichaamsvloeistof, bij voorkeur urine.

15 Een werkwijze voor het diagnostiseren en/of prognostiseren van osteoarthritis in een lichaamsvloeistof van een individu van een zoogdier volgens de uitvinding omvat de kwantitatieve of kwalitatieve detectie van een biomarker volgens de uitvinding in een lichaamsvloeistof van een individu van betreffend zoogdier.

20 Genoemde biomarker kan op verschillende wijzen worden gedetecteerd in een lichaamsvloeistof. Zo kunnen bijvoorbeeld NMR en/of Massa Spectrometrie (MS) worden toegepast op een monster van een lichaamsvloeistof.

Een eenvoudigere en snellere diagnose zou gesteld kunnen worden  
25 door toepassing van microsysteemtechnologieën, bijvoorbeeld een "microfluidics" instrument in combinatie met specifiek fluorescerende enzymen waarmee kwantitatief en kwalitatief de metabolieten voorkomend in de te testen samples gemeten kunnen worden. De vakman zal zich zonder veel problemen op de hoogte kunnen stellen van de stand van de techniek op  
30 het gebied van de snelle detectie van metabolieten om werkwijzen op te

stellen voor het detecteren van biomarkers volgens de onderhavige uitvinding in een lichaamsvloeistof van een zoogdier ter diagnose en/of prognose van osteoarthritis. (Zie bijvoorbeeld Microfabrication Technology for Biomedical Innovations. Proc. Cambridge Healthtech Inst. 3rd Annual  
 5 Conf., October 1997, San Jose, USA)

Bij voorkeur wordt een biomarker volgens de onderhavige uitvinding gedetecteerd in urine..

Met behulp van de onderhavige systemen en werkwijzen kan osteoarthritis op kwalitatieve en semi-kwantitatieve wijze worden  
 10 vastgesteld. Hiertoe kan bijvoorbeeld een database worden samengesteld van sets aan NMR spectra van metabolieten in een lichaamsvloeistof van aan osteoarthritis lijdende individuen waarbij de ziekte zich in verschillende stadia van progressie bevindt en waarbij deze sets worden geannoteerd aan  
 15 kwantitatieve gegevens van de progressie van de ziekte, bijvoorbeeld de wijde van de gewrichtsholte. Door het opstellen van verschilprofielen voor osteoarthritis in verschillende stadia van progressie kan een kwantitatieve reeks van verschilprofielen worden verkregen. Middels het uitvoeren van een vergelijking tussen een NMR spectrum van een individu waarin  
 20 osteoarthritis wordt vermoed of waarvan de ernst van de ziekte moet worden bepaald en de genoemde kwantitatieve reeks van verschilprofielen kan de aanwezigheid van osteoarthritis kwantitatief worden uitgedrukt. Voorts kan de voortschrijding van de ziekte kwantitatief worden gevolgd.

Deze analyses van osteoarthritis, de kennis van de pathogenese en de efficiëntie van therapieën kunnen door toepassing van de onderhavige  
 25 uitvinding sterk verbeteren. De uitvinding kan worden toegepast op zoogdieren in het algemeen en paardachtigen, runderachtigen, varkensachtigen, schaapachtigen, muisachtigen, hondachtigen, knaagdierachtigen, aapachtigen in het bijzonder. Bij voorkeur wordt de uitvinding toegepast op cavia's, honden of mensen.



De uitvinding zal hieronder worden geïllustreerd aan de hand van een voorbeeld.

Voorbeeld 1.

5 *Monster voorbereiding*

Voorafgaand aan NMR spectroscopische analyse werden 1 ml urine monsters gelyophiliseerd en gereconstitueerd in 1ml natrium fosfaat buffer (pH 6.0, op basis van D<sub>2</sub>O) met 1 mM natrium trimethylsilyl-[2,2,3,3, 2H<sub>4</sub>]-1-propionaat (TMSP) als interne standaard.

10

*NMR metingen*

NMR spectra werden in drievoud en volledig geautomatiseerd opgenomen op een Varian UNITY 400 MHz spectrometer voorzien van een proton NMR set-up en bij een werkingstemperatuur van 293 K. Free  
15 induction decays (FIDs) werden verzameld als 64K datapunten met een spectrale bandbreedte van 8000 Hz; 45 graden pulsen werden toegepast met een meettijd van 4,10 sec. en een ontspanningsvertraging ("relaxation delay") van 2 sec. De spectra werden bepaald door accumulatie van 128 FIDs. Het signaal van het residuele water werd verwijderd middels een  
20 voor-verzadigingstechniek waarbij de water-piek werd bestraald met een constante frequentie gedurende 2 sec voorafgaand aan de meetpuls.

De spectra werden bewerkt met behulp van de standaard Varian software. Op alle spectra werd een exponentiele window-functie met een lijnverbreding van 0,5 Hz en een handmatige basislijn correctie toegepast.

25

Na referentie met de interne NMR standaard (TMSP  $\delta = 0,0$ ) werden lijnreeksen samengesteld met behulp van de standaard Varian NMR software. Ter verkrijging van deze lijnreeksen werden alle lijnen in de spectra met signaal intensiteit boven de ruis verzameld en omgezet naar een gegevensbestand dat geschikt was voor toepassing van multivariate  
30 data-analyse.

*Bepaling van metabole fingerprint of verschilprofiel van osteoarthritis  
metabolieten*

Met behulp van een 400 MHz NMR spectrometer werden  
 5 urinemonsters onderzocht van gezonde individuen en van osteoarthritis  
 patiënten, waarin de conditie klinisch en histo-pathologisch was  
 vastgesteld. De spectra werden verwerkt en lijnreeksen werden  
 samengesteld met behulp van standaard Varian software na referentie aan  
 de interne standaard. Het NMR datareductiebestand werd geïmporteerd in  
 10 Winlin VI. 10. Kleine variaties van vergelijkbare signalen in verschillende  
 NMR spectra werden aangepast middels toepassing van het  
 Partial-Linear-Fit algoritme zoals beschreven in WO 02/13228 en de lijnen  
 werden gefit zonder verlies in resolutie. De schaal van de data werd  
 automatisch aangepast en "genormaliseerd" naar eenheidsintensiteit. De  
 15 endogene en exogene metabolieten werden geëlimineerd van de NMR  
 spectra, hetgeen leidde tot het reduceren van de data tot specifieke en  
 "significante" osteoarthritis-gerelateerde veranderingen. Hiertoe werd een  
 grenswaarde toegepast waarmee 80-90% van de spectraallijnposities werd  
 geëlimineerd.

20 Een score plot van de bewerkte NMR spectra werd gemaakt met  
 behulp van multivariate data-analyse als bovenomschreven. Uit het score  
 plot werd een metabole fingerprint of referentieprofiel van osteoarthritis  
 verkregen door het selecteren van stijgende en dalende NMR signalen met  
 relatief hoge frequentie van voorkomen in urine van osteoarthritis  
 25 patiënten. Hieruit werd een keus gemaakt van ongeveer 35 NMR signalen  
 met een relevante bijdrage aan osteoarthritis (regressie  $>0.5$ ). Deze NMR  
 signalen zijn weergegeven in Tabel 1 en Figuur 2.

30 *Tabel 1: Kenmerkende stijgende en dalende NMR spectraallijnposities  
 vanwege osteoarthritis*

| NMR spectraallijnposities met stijgende<br>waarden vanwege osteoarthritis<br>in ppm $\pm$ 0.05 | NMR spectraallijnposities met dalende waarden<br>vanwege osteoarthritis<br>in ppm $\pm$ 0.05 |
|--|--|
| 1.35   | 0.93   |
| 1.65   | 1.20   |
| 2.00   | 1.33   |
| 2.17   | 1.45   |
| 2.23   | 1.48   |
| 2.42   | 1.90   |
| 2.45   | 2.75   |
| 2.48   | 3.20   |
| 2.50   | 4.13   |
| 2.58   | 6.63   |
| 2.80   | 7.30   |
| 2.88   | 8.32   |
| 2.90   |  |
| 3.02   |  |
| 3.08   |  |
| 3.10   |  |
| 3.30   |  |
| 3.50   |  |
| 3.65   |  |
| 4.03   |  |
| 4.33   |  |
| 5.97   |  |
| 6.42   |  |
| 6.45   |  |
| 6.78   |  |

## CONCLUSIES

1. Verschilprofiel voor de detectie van osteoarthritis in een zoogdier, omvattende een meervoudigheid van spectraallijnposities en optioneel bijbehorende signaalintensiteiten van NMR spectraallijnen, die het genormaliseerd verschil uitdrukken tussen één of meer NMR spectra van  
5 metabolieten in een lichaamsvloeistof van één of meer gezonde individuen van genoemd zoogdier, en één of meer overeenkomstige NMR spectra van metabolieten in een overeenkomstige lichaamsvloeistof van één of meer individuen van genoemd zoogdier waarin osteoarthritis is vastgesteld.
2. Verschilprofiel volgens conclusie 1, waarin genoemd zoogdier is  
10 gekozen uit de groep bestaande uit mensen, honden en cavia's.
3. Verschilprofiel volgens conclusie 1 of 2, waarin genoemde lichaamsvloeistof urine is.
4. Verschilprofiel volgens conclusie 3, omvattende de spectraallijnen en daarbij corresponderende waarden volgens tabel 1.
- 15 5. Werkwijze voor de detectie van osteoarthritis in een zoogdier, omvattende de stappen van het verschaffen van een NMR spectrum van metabolieten in een lichaamsvloeistof van een individu van genoemd zoogdier waarin osteoarthritis wordt vermoed en het vergelijken van genoemd NMR spectrum met een verschilprofiel volgens één van de  
20 conclusies 1-4, bepaald voor een overeenkomstige lichaamsvloeistof.
6. Werkwijze volgens conclusie 5, waarin genoemd zoogdier is gekozen uit de groep bestaande uit mensen, honden en hamsters.
7. Werkwijze volgens conclusie 5 of 6, waarin genoemde lichaamsvloeistof urine is.
- 25 8. Werkwijze voor het vervaardigen van een verschilprofiel voor osteoarthritis in een zoogdier, omvattende de stappen van: a) het verschaffen van een eerste set van waarden voor lijnen in een NMR

- spectrum opgenomen van metaboliëten in een lichaamsvloëistof van één of meer gezonde individuen van genoemd zoogdier; b) het verschaffen van een tweede set van waarden voor lijnen in een NMR spectrum opgenomen van metaboliëten in een overeenkomstig lichaamsvloëistof van één of meer
- 5 individuen van genoemd zoogdier waarin osteoarthritis is vastgesteld; en c) het detecteren van de verschillen tussen de genormaliseerde waarden van genoemde eerste en tweede set, ter verkrijging van genoemd verschilprofiel.
9. Werkwijze volgens conclusie 8, waarin de bepaling van genoemde genormaliseerde waarden de toepassing van de methode volgens WO
- 10 02/13228 omvat.
10. Biomarker voor diagnose en prognose van osteoarthritis, met het kenmerk dat de biomarker wordt gevormd door ten minste één verbinding omvattende een metaboliet gekozen uit de groep bestaande uit melkzuur, appelzuur, mercaptuurzuur, acetyl cysteine, monofosfaat verbindingen en
- 15 functionele analogen daarvan.
11. Werkwijze voor diagnose en prognose van osteoarthritis, omvattende het detecteren van veranderingen in het voorkomen van een biomarker volgens conclusie 10 in een lichaamsvloëistof van een individu van genoemd zoogdier waarin osteoarthritis wordt vermoed.
- 20 12. Werkwijze voor de identificatie van een biomarker voor osteoarthritis, omvattende het vervaardigen van een verschilprofiel volgens conclusie 8 en het identificeren van een metaboliet gekenmerkt door één of meer gedefinieerde spectraallijnen in genoemd verschilprofiel.



102175

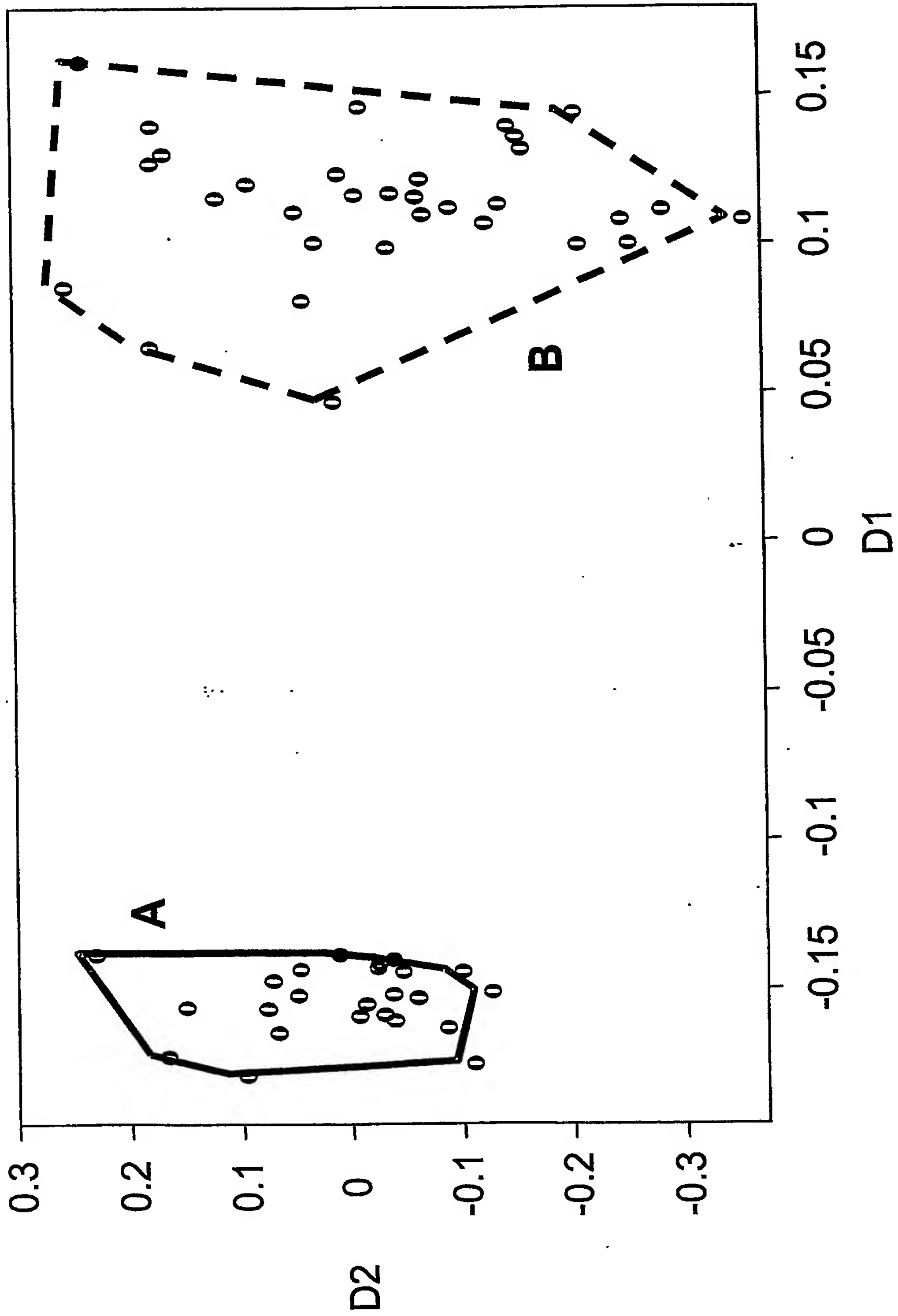
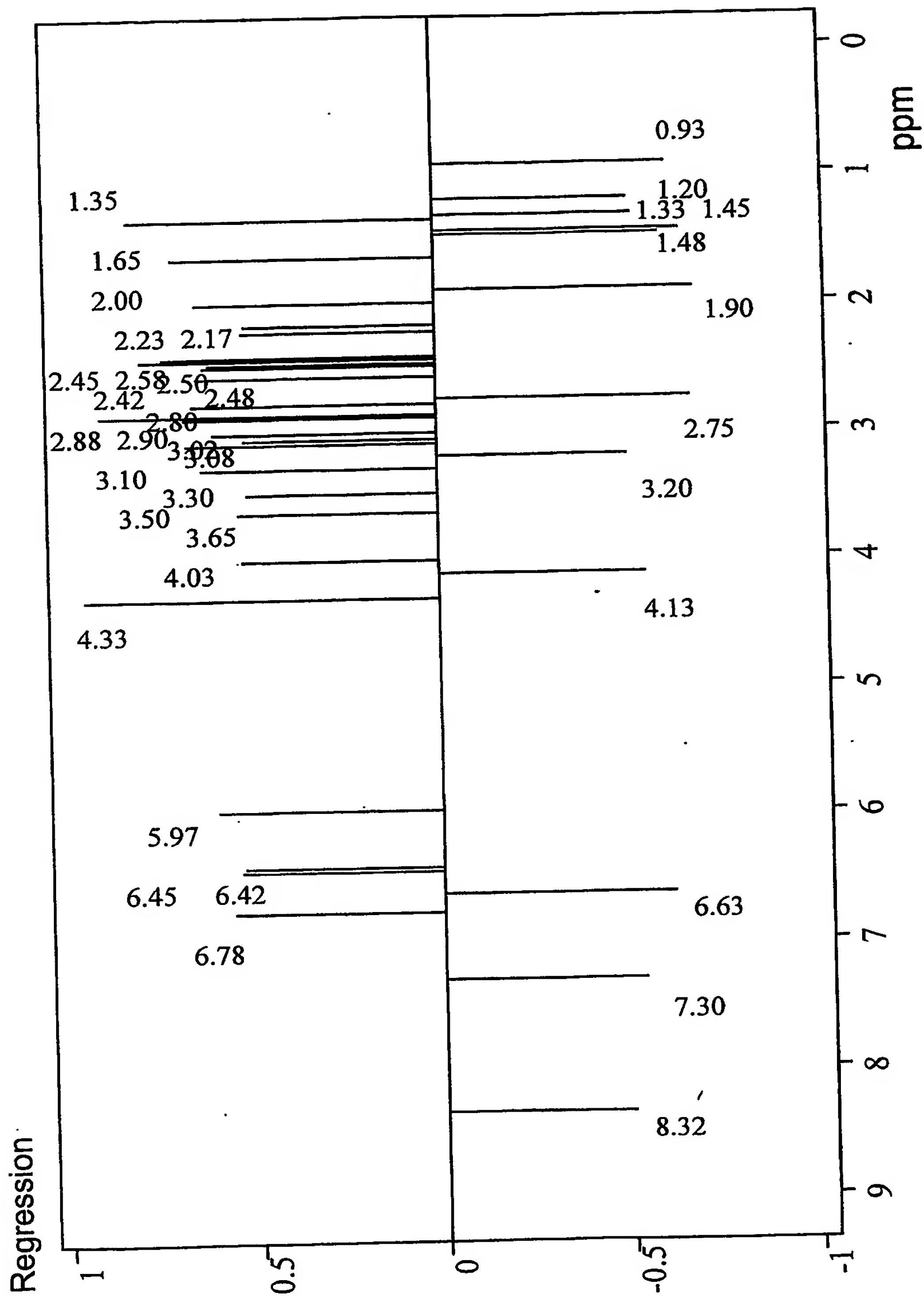


Figure 1

1021753



Figuur 2

2-H